

## <原著>ラット下顎骨骨欠損モデルにおける骨の可動性と薬剤が骨欠損治癒過程に及ぼす影響についての研究

著者名(日)	福田 恵
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	15
号	2
ページ	163-180
発行年	1996-12-31
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00008185/">http://id.nii.ac.jp/1145/00008185/</a>

〔原 著〕

ラット下顎骨骨欠損モデルにおける骨の可動性と薬剤が  
骨欠損治癒過程に及ぼす影響についての研究

福田 恵

北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

(主任：金子昌幸教授)

An Experimental Study on the Influence of  
Bone Mobility and Drug in the Healing process of  
Bone Fracture.

Megumi FUKUDA

Department of Dental Radiology, school of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

(Director Prof Masayuki KANEKO)

**Abstract**

This study was performed to investigate the healing process of bone trauma and the effect of Solcoseryl

One hundred twenty six Wistar rats were used and divided into 3 groups Bone defects(15×4mm) on the mandibles were made as the control The same defects were made on the faulty unions to break mandibles as an experimental group Solcoseryl(1ml/kg/day) was administered to the other experimental group The healing process was evaluated histopathologically, histometrically and radiologically

From the histological and histometrical findings, the active osteoid bone formation was observed on the edge of the defect On the other hand, periosteal new bone formation was produced in the healing process following periosteal reaction on the faulty unions New cartilage was produced on the faulty unions more than the control In the Solcoseryl administered rats, active periosteal reaction was seen and the amount of new bone was increased on the early stage It was suggested that Solcoseryl might accelerate the wound healing

---

本論文の要旨は第34回日本歯科放射線学会総会 (平成5年6月), 第35回歯科基礎医学会総会 (平成5年6月) において発表した。

受付 平成8年9月30日

**Key words** rat mandible, fracture, cartilage cell, solcoseryl<sup>®</sup>, membranous bone

## I. 緒 言

骨折の治癒機転については古くから多くの報告があり、特に長管骨を用いた研究が広く行われてきている<sup>1)</sup>。その修復過程は一般に、形態的所見から炎症期、修復期、リモデリング期の3期に分類されているが、感染、固定の有無や欠損の大きさなどにより時間的経過は流動的である<sup>2-5)</sup>。長管骨をはじめ頭蓋底部の骨、椎骨、骨盤などはその発生過程あるいは、治癒過程において軟骨内骨化の過程を経ることから軟骨性骨と呼ばれている。これに対し前頭骨、頭頂骨、後頭骨、側頭骨、下顎骨などの顎顔面骨の大半は膜性骨化により形成されることから膜性骨と呼ばれている。軟骨性骨と膜性骨の治癒過程に相違のあることも古くから指摘されているが<sup>6)</sup>、特に膜性骨における治癒過程での軟骨組織の出現の有無については、未だ議論の絶えないところである<sup>7-18)</sup>。これまで膜性骨の骨折あるいは骨傷の治癒過程は病理組織学的および放射線学的検討<sup>19-26)</sup>、機能的または力学的検討<sup>27-31)</sup>、血管の走行に関する検討<sup>32-35)</sup>、各種薬剤の及ぼす影響<sup>36-40)</sup>などについて検討が行われてきた。これらの実験では動物種の違いや実験部位、骨傷の作成方法の違いから一様に比較検討することは容易ではないが、一般的に生理的な治癒過程においては軟骨組織を介さないものの、骨折後の不十分な固定により軟骨組織を誘導するという報告が支持されてきている<sup>45)</sup>。骨折後の固定にはワイヤー、プレートが用いられているが、特に下顎骨においては三次元方向からの筋組織の伸縮などにより必ずしも完全な固定状態を得られているとはいいがたい。さらに、下顎骨においては骨折後固定をしないもの、すなわち骨折部が可動性のものと完全固定を試みたものとの比較検討したものは見あたらず、

その詳細については不明な点も少なくない。

本研究の目的は、1) 膜性骨である下顎骨に完全に骨の離断を行った可動性骨欠損と、骨穿孔による骨欠損を作成した非可動性骨欠損の治癒過程を経時的に比較観察すること、2) 両者の治癒過程における軟骨組織の出現の有無を検索すること、3) 可動性骨欠損と非可動性骨欠損の両者について、膜性骨骨傷治癒過程研究の実験モデルとしての有用性を検討すること、4) 3) で使用した本モデルに対して創傷治癒の促進効果が広く知られている薬剤、ソルコセリル<sup>®</sup>、の投与を行い、薬剤による影響について検討することである。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物

実験には7週齢のWistar系雄性ラット(三協ラボサービス、東京)126匹を使用した。ラットは一定条件下(室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ )で予備飼育し8週齢で実験に供した。飼育中は固形資料(MF<sup>®</sup>、オリエンタル酵母、東京)と水道水を自由摂取させた。

### 2. 実験部位

実験部位は膜性骨の性質を忠実に観察するために、歯牙の影響を受けない左側下顎骨顎角部とした。

### 3. 実験方法

#### 1) 実験1 可動性骨欠損と非可動性骨欠損の治癒過程の観察および実験モデルとしての検討

84匹のラットを42匹ずつ2群に分け、一方には下顎角部の骨の離断を行い、もう一方には下顎角部に骨の穿孔を行い、骨欠損を作成した。前者を可動性骨欠損群、後者を非可動性骨欠損群とし、各群7匹ずつ屠殺し放射線学的および病理学的方法を用いて経時的に観察した。

##### (1) 骨欠損作成方法

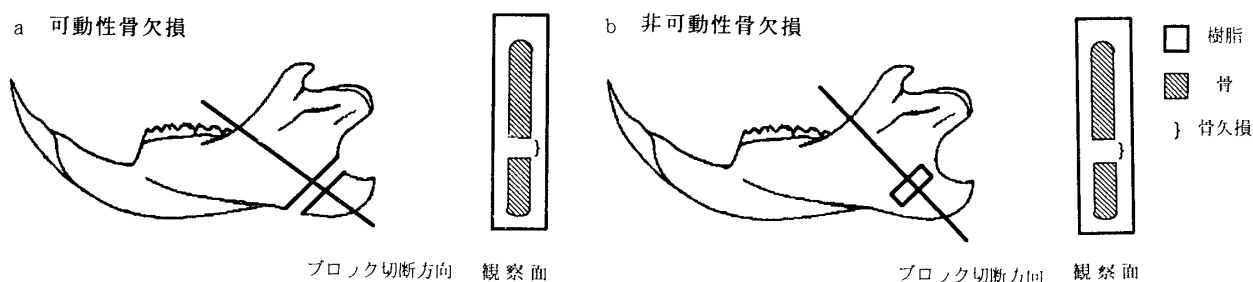


図1. 骨欠損作成模式図

## ①可動性骨欠損

ラットをペントバルビタールナトリウム（ネンブタール<sup>®</sup>，ダイナボット，大阪）の腹腔内麻酔下において術部を剃毛し，次いで頬部皮膚を横切開し，咬筋を露出した。咬筋は筋の走行に沿って縦断剝離し，下顎骨を露出した。下顎骨の骨膜は剝離せず，生理食塩水で注水しながら，携帯用エンジン（Trix<sup>®</sup>，モリタ，東京）とダイヤモンド・バー（130—B，松風，京都）を用い下顎角部を離断した（図1 a）。下顎骨の咬筋付着は保存し，咬筋の運動が障害されないようにした。離断後は筋層・皮膚の各創を縫合した。

## ②非可動性骨欠損

可動性骨欠損群と同方法で下顎骨の露出を行い，1.5×4 mmに下顎角部を穿孔し縫合した（図1 b）。

可動性骨欠損群および非可動性骨欠損群は，骨欠損作成後，予備飼育と同方法で飼育した。

## (2)標本作成方法

## ①観察日程

観察は骨欠損作成直後，3，7，14，21，28日目に行った。

## ②組織固定方法

ラットをペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下で開胸，左心室より上行大動脈までカテーテルを挿入し大動脈より灌流固定した。固定液は変法Karnovsky固定液（PH7.4，0.12M Sorensen buffer，2%パラホルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドを含む）を用いた。拍出量はInfusion pump（MP-25，Sharp，大阪）

を使用し，4.0ml/minに調整した。下顎骨摘出に際し離断した骨が偏位を起こさないように，下顎骨周囲の筋肉の硬化を確認し，固定を終了した。固定後は左側下顎骨を摘出し，軟X線写真撮影のために軟組織の厚さを一定にした。

軟X線写真撮影後7匹のうち5匹を非脱灰標本に，2匹を脱灰標本にした。

## ③非脱灰標本

実体顕微鏡下で新生骨を損傷しないように，また可動性骨欠損においては遊離骨片の移動を起こさないように可及的に軟組織を除去した。通法に従い上昇アルコール系で脱水，スチレンモノマーで置換し，ポリエステル樹脂（Rigolac<sup>®</sup>，応研商事，東京）に包埋，60℃で重合硬化させた。硬化後は骨欠損の中央部で骨欠損に対し垂直方向に切断し，切断した面において厚さ80μmの研磨切片を作成した。

## ④脱灰標本

組織を80%アルコールで脱脂，14.5%EDTA溶液で脱灰した。脱灰1週間目に非脱灰標本と同様に骨欠損の中央で切断，左右3mmの小ブロックにし，約50日間脱灰を続けた。脱灰終了後は通法に従いパラフィン切片を作成した。

## (3)観察方法

## ①放射線学的観察

## a. 軟X線写真

非脱灰および脱灰標本作成に先立ち軟エックス線写真を撮影した。撮影には軟エックス線発生装置（Sofron Model BST-I 1505CX<sup>®</sup>，綜研，東京）と軟エックス線用超微粒子フィルム（コ

ニカコンタクトフィルム CS100E<sup>®</sup>, コニカ, 東京)を用いた。撮影条件は、管電圧30kvp・管電流 5 mA・距離30cm・時間60secで行った。フィルムの現像および定着は指定通りに実施した。撮影したフィルムをシャーカステン上で観察した。

#### b. Contact microradiography

80 $\mu$ mの研磨標本を用い、Contact microradiography (CMR) を撮影した。撮影には超軟エックス線発生装置 (Softex CMR型, 日本ソフテックス, 東京) とCMR用フィルム (High resolution film SO-343<sup>®</sup>, 日本Kodak, 東京) を使用した。管電圧10kvp, 管電流 5 mA, 距離10cm, 時間30minの条件で撮影した。フィルム処理は指定に従い、撮影したフィルムを顕微鏡下で観察した。

#### ②病理組織学的観察

パラフィン切片を用い、以下の染色を施して顕微鏡下で観察した。

- a. Hematoxylin eosin染色 (以下, HE 染色)
- b. Alcian blue染色 (以下, AB 染色)
- c. Toluidine blue染色 (以下, TB 染色)

#### ③画像解析による骨欠損の評価

画像解析には①の a で得た軟X線写真を用いた。画像解析は画像処理装置TVIP4100(オリンパスアビオ, 東京) と解析ソフトコマンド4198から成るXL500を使用した。両骨欠損の軟X線写真を使用し、上記装置にTVカメラで取り込み、X線透過度差によりカラー化し、次に骨欠損内部の新生骨未形成部分の面積を二値化処理を行うことにより測定した。また、可動性骨欠損群では骨離断による骨欠損部分を含む下顎角部の面積の測定も行った。なお、測定は実測値を入力し実測値計算で行った。またStudentの t 検定を行い、有意差を求めた。

#### 2) 実験 2 薬剤による影響の検討

42匹のラットを用い実験 1 の非可動性骨欠損

群と同様の骨欠損を作成し、ソルコセリル<sup>®</sup> (以下SS) (Solcobasel, Swizerland) を投与した群の治癒過程を経時的に観察し、この群をSS投与群とし、また実験 1 の非可動性骨欠損群を対照とし、SS非投与群とした。

#### (1)投与方法

SSは骨欠損作成直後から屠殺前日まで、1 ml/kg/dayを大臀部に連日筋肉内注射した。

#### (2)標本作成方法

実験 1 と同方法で固定・標本作成を行った。

#### (3)観察方法

骨欠損作成直後、3, 7, 14, 21, 28日目に7匹ずつ屠殺して、以下の観察を行った。

##### ①放射線学的観察

- a. 軟X線写真
- b. CMR

##### ②病理組織学的観察

- a. HE 染色
- b. AB 染色
- c. TB 染色

##### ③画像解析による検索

実験 1 と同様の方法で、SS投与群およびSS非投与群の、骨欠損内部の新生骨未形成部分の面積を測定し、両者を比較した。また、Studentの t 検定を行い、有意差を求めた。

### III. 結 果

#### 1. 実験 1

##### 1) 可動性骨欠損

##### (1)放射線学的観察

##### ①軟X線写真

骨傷作成直後の骨傷端は極めて平滑かつ鮮鋭であり、3日目に至っても同様の所見を示した。下顎角部は完全に離断され、骨欠損部の帯状のX線透過像をはさみ、下顎角は遊離していた。骨切削された部分はバー幅とほぼ等しいX線透過像として観察された (図2a)。7日目では、遊離した下顎角が近心的転位を生じ、下顎体部

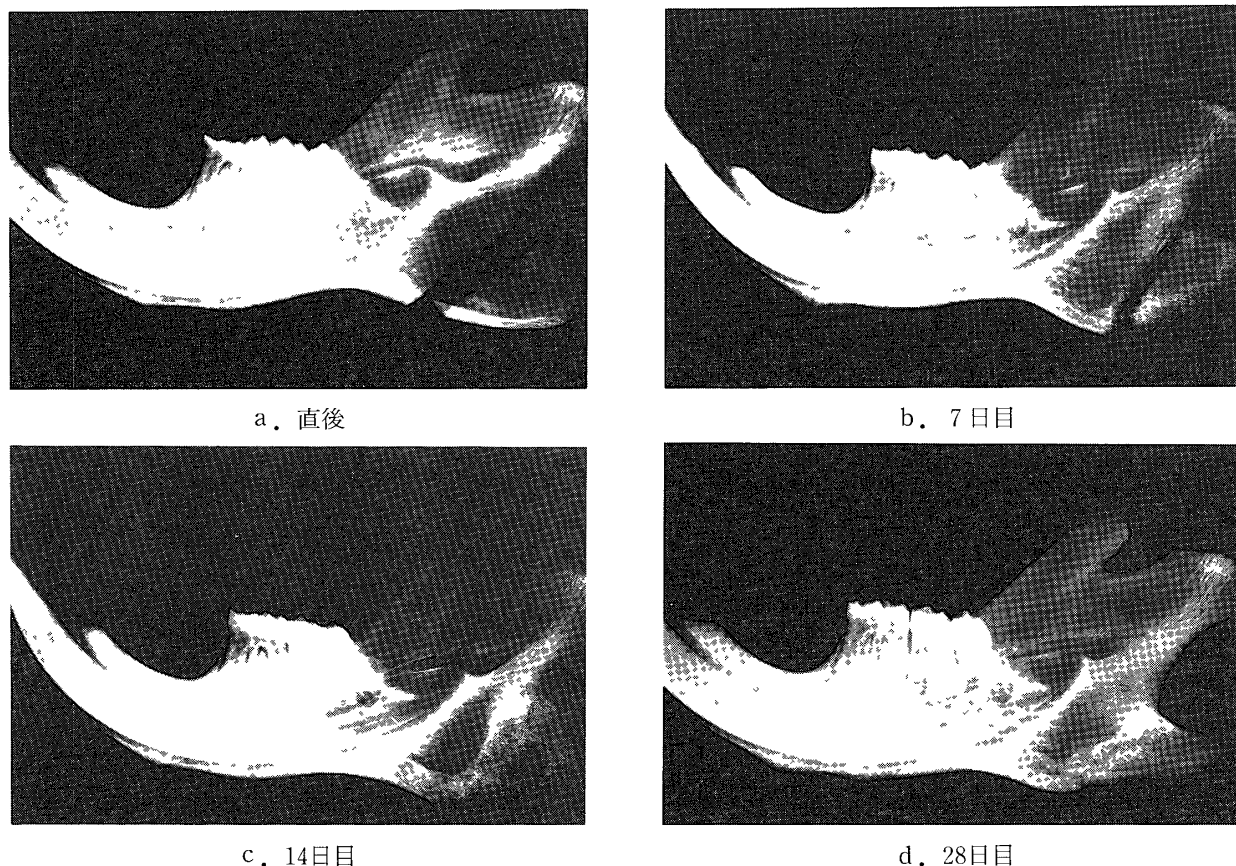


図2. 可動性骨欠損群, 軟X線写真。

に近づき欠損幅が短縮されているのが認められた。また骨欠損内部に縦走する糸状の不透過像と骨辺縁内部の不規則な骨吸収像が観察された(図2 b)。14日目では、転位した状態で新生骨による架橋が観察されたが、中心部は未だに周囲の骨より強いX線透過性を呈した(図2 c)。21日目では、14日目に比較し架橋部のX線不透過性の亢進が認められた。28日目では、離断部に带状の離断痕が観察されるが下顎骨部の既存骨とほぼ同程度のX線不透過性を示した。また、下顎角部とくに離断部が架橋した部分において骨梁走行の乱れが観察された。下顎骨全体としては離断した下顎角部の移動による下顎骨の変形、とくに下顎角部の短小化が認められた(図2 d)。

## ②CMR

直後では離断された骨断端部は直線状を成し、骨欠損の左右の既存骨は正常な層板構造を

呈した(図3 a)。3日目で、軟X線写真では観察されなかった骨断端隅角部のごく僅かな骨吸収が観察された。7日目では頬舌的な骨偏位と両骨断端の接近および欠損幅の短縮が認められた。また遠心側骨断端においては骨の吸収が著明に認められた。既存骨から連続する著明な外骨膜反応とそれに伴う波状の仮骨形成が観察されるが、外骨膜反応と仮骨形成は頬側に強く認められた(図3 b)。14日目では、放射状の仮骨と架橋部における骨皮質の肥厚が観察された。ここでも仮骨形成は頬側に強く認められた(図3 c)。21日目では放射状を呈していた仮骨は網状を呈するようになった。また、14日目に比較すると骨梁幅の増幅が認められ、それに伴う骨梁の緻密化も観察された。28日目では骨皮質の肥厚は吸収され、骨の一部は層板状を呈するようになり、また骨髓腔の形成が観察された(図3 d)。

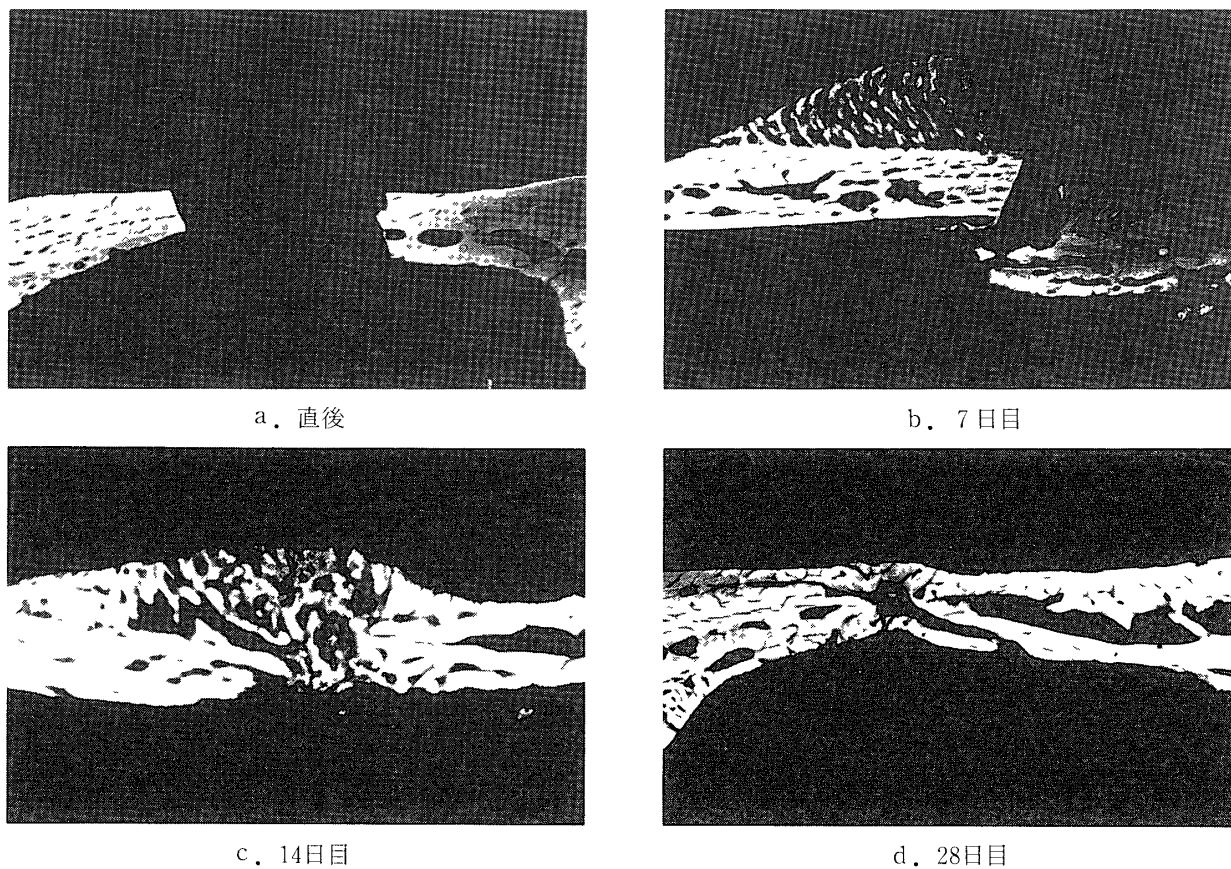


図3. 可動性骨欠損群, CMR.

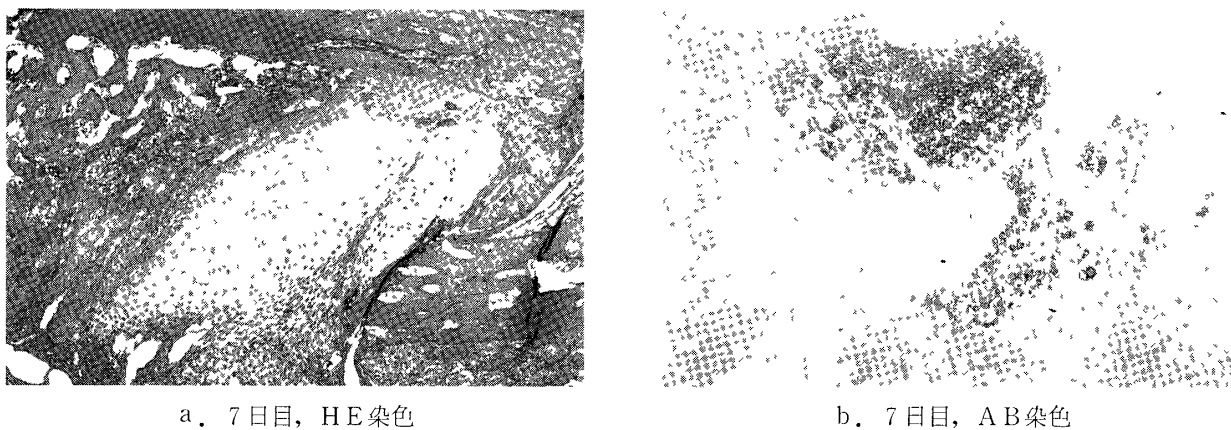


図4. 可動性骨欠損群, 病理組織像.

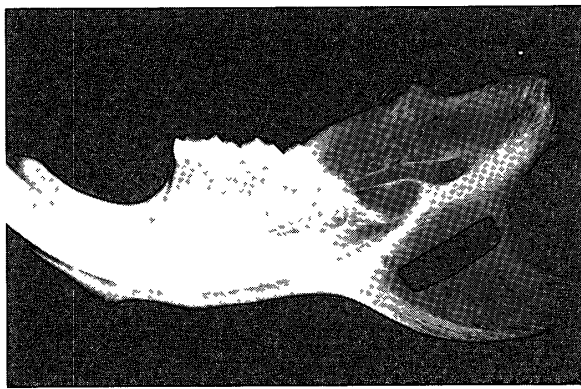
## (2) 病理組織学的観察

骨欠損作成直後では, その一部に凝血塊が認められる。やがて血腫は吸収され, 線維芽細胞の増殖と毛細血管に富んだ肉芽組織の形成が認められた。また残された骨片は破骨細胞により吸収されている所見も認められた。外骨膜反応による骨芽細胞に縁取られた外仮骨, 断端部より内仮骨形成が認められるようになる。出現し

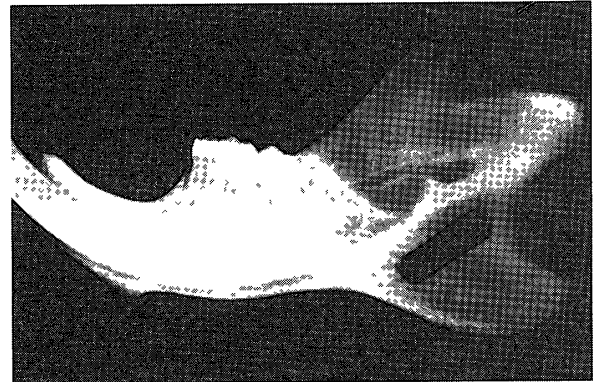
た軟骨は置換され, 軟骨内骨化および類骨を経て仮骨が形成され, 骨断端が連結されている。

7日目および14日目のHE染色において, 軟骨組織が観察された(図4 a)。HE染色で軟骨組織が観察されたものについて連続切片を用いてAB染色を施したところ, 青色に染まる軟骨基質を確認した(図4 b)。

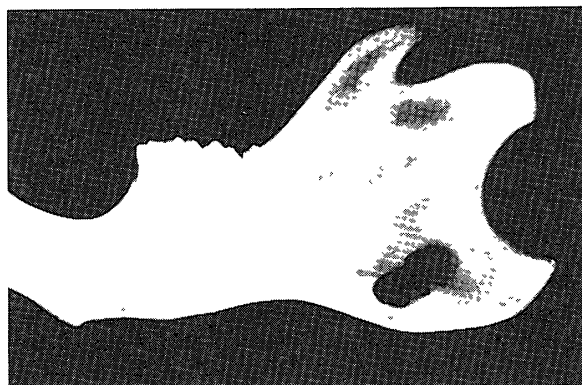
## 2) 非可動性骨欠損



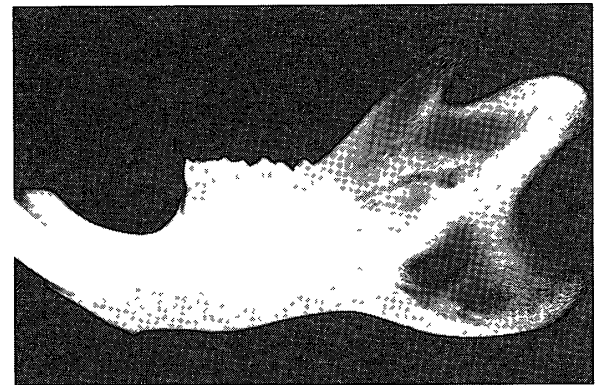
a. 直後



b. 7日目



c. 14日目



d. 28日目

図5. 非可動性骨欠損群, 軟X線写真.

### (1)放射線学的観察

#### ①軟X線写真

直後では、 $1.5 \times 4$  mmに穿孔した部分が長方形のX線透過像として観察された(図5a)が、3日目まで同様の所見を呈していた。7日目では、骨辺縁から欠損内部に向かう弱いX線不透過像が認められた(図5b)。14日目では欠損内部に向かうX線不透過像の増加による骨欠損の縮小が観察され、7日目と比較して不透過性の亢進が認められた(図5c)。21日目では14日目同様に不透過像の増加と不透過性の亢進が観察されるが、架橋は認められず骨欠損の中心は直後同様のX線透過性を呈した。28日目では骨欠損内部に向かう不透過像が周囲の既存骨とほぼ同程度のX線不透過性を呈した。しかしながら骨欠損中央部では未だ透過像の残存が観察された(図5d)。

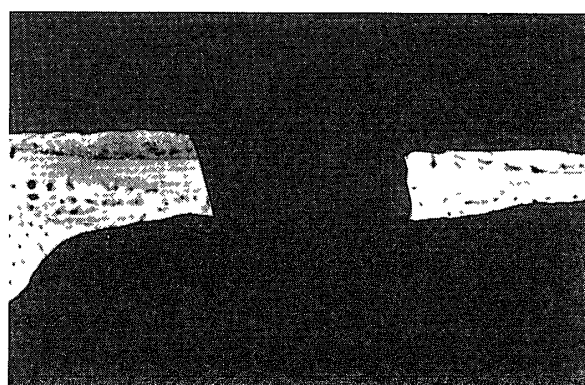
#### ②CMR

直後では骨断端部は直線状を成し(図6a)、3日目になると骨断端部で不規則な骨吸収像が観察された。7日目では骨断端から直接形成された新生骨と、可動性骨欠損より弱い外骨膜反応が観察された(図6b)。14日目では新生骨は網状を呈し、形成量の増加が認められた(図6c)。21日目では新生骨骨梁の幅の増幅による緻密化は認められるが、骨皮質の肥厚は観察されなかった。また、欠損内部方向への骨新生は認められるが頬舌方向への形成は認められず、鋸状の形態を呈している。28日目でも未だ架橋は認められないものの、新生骨の石灰化はさらに亢進し、骨はすでに層板状を呈した(図6d)。

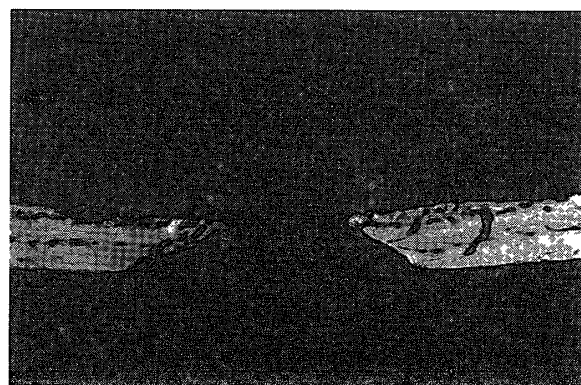
### (2)病理組織学的観察

直後では、凝血塊が認められ、やがて骨膜からの線維芽細胞の増殖および毛細血管の増殖が著しく、骨欠損部は肉芽組織により満たされ、骨芽細胞の分化増殖、一部に軟骨組織が認めら

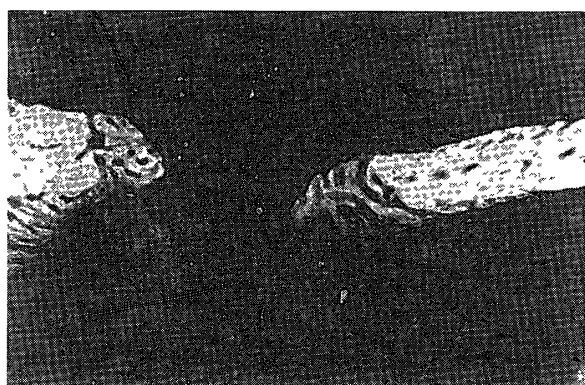




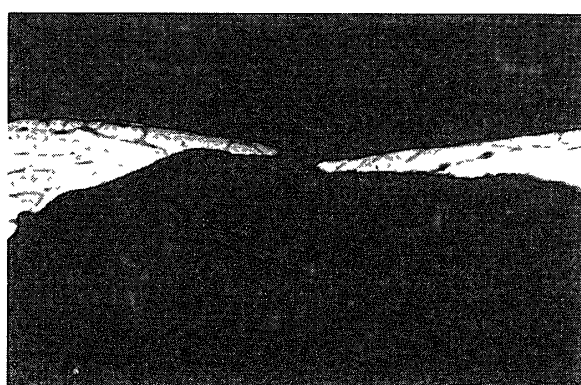
a. 直後



b. 7日目

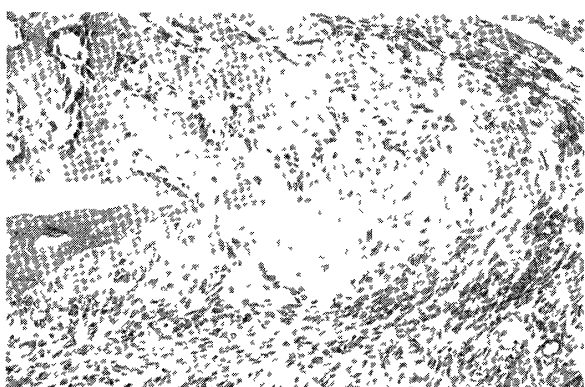


c. 14日目



d. 28日目

図6. 非可動性骨欠損群, CMR.



a. 7日目, HE染色



b. 7日目, TB染色

図7. 非可動性骨欠損群, 病理組織像.

れた。外骨膜および骨断端より仮骨形成がおり骨欠損部を充足していく所見が認められた。

7および14日目のHE染色において骨断端の先端で軟骨細胞様の細胞が観察された(図7a)。AB染色では青色に染まる軟骨基質が確認され、またTB染色を施したところ、青紫色にメタクロマジーを呈したことから軟骨細胞であることが確認された(図7b)。

### (3)画像分析

可動性骨欠損群においては、骨片の偏位が認められた7日目では骨欠損部分面積の測定を行うのが困難となり、骨癒合した14日目以降は欠損部分の面積の測定は不可能であった。下顎体の骨離断部辺縁から骨欠損を含む下顎角部全体の面積を測定した結果から14日目で顎角部の面積は極端に減少し、骨削除幅の分下顎角が下顎

表1 可動性骨欠損群の骨欠損面積

観察日	離断した部位の 骨欠損面積	骨欠損を含む 下顎角部の面積
0	7.94±1.24	27.40±4.17
3	7.04±1.33	22.70±4.77
7	not done	13.70±2.21
14	not done	10.67±5.80
21	not done	20.10±9.98
28	not done	14.60±4.97

平均値±標準偏差 (mm<sup>2</sup>)

体部に移動したことが推測された(表1, 図8 a—d)。また, 可動性骨欠損は骨の偏位を生じるため実験動物により骨欠損面積が異なり測定面積の差も大きかった。

非可動性骨欠損は, 骨片の偏位を生じることはなく, 作成した骨欠損面積も比較的均一で誤差は少なかった(表2, SS非投与群)。

## 2. 実験2

### 1) SS非投与群

実験1の非可動性骨欠損群と同様である。

### 2) SS投与群

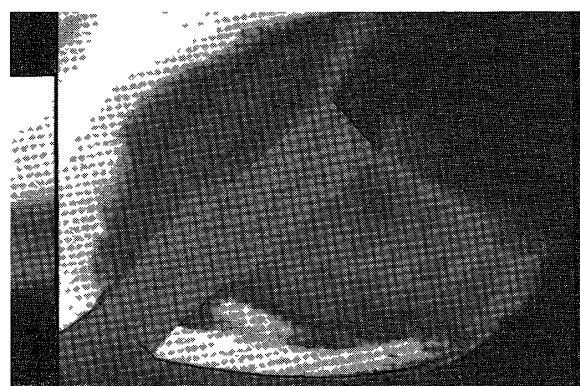
#### (1)放射線学的観察

##### ①軟X線写真

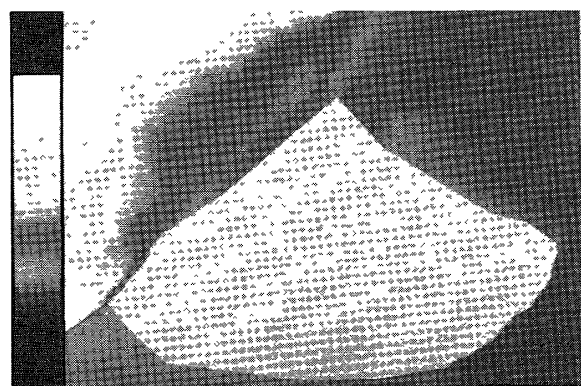
骨欠損作成直後および3日目では長方形に骨欠損が観察され(図9 a), 7日目では骨欠損内部に向かう不透過像が観察される(図9 b)。14, 21, 28日目と経時的に不透過性の亢進も認められ, 28日目では骨欠損は不透過像で満たされた(図9 c, d)。

##### ②CMR

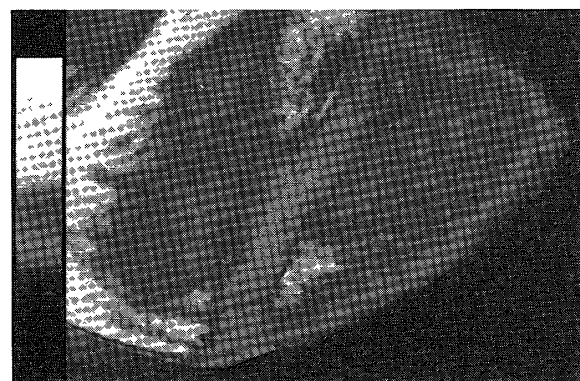
3日目では骨断端に既に新生骨の形成が認められ始め, 7日目では非投与群に比べやや強い外骨膜反応による仮骨形成と骨断端からの新生骨の形成が観察されたが可動群のように橋渡し架橋の形成は見られなかった。(図10 b)。14, 21日目と新生骨は骨断端から欠損内方と伸展しその形成量の増加が認められた(図10 c)。しか



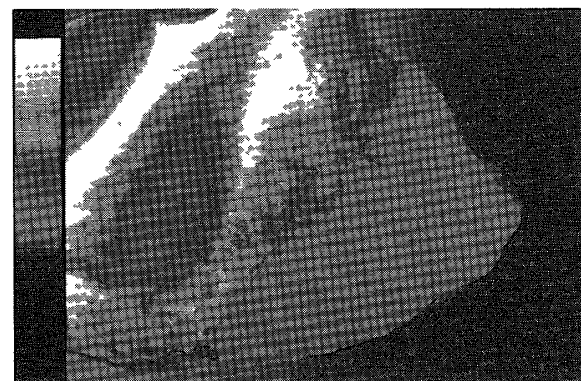
a. 直後欠損部分の二値化像



b. 直後の骨欠損部分を含めた下顎角部の二値化像

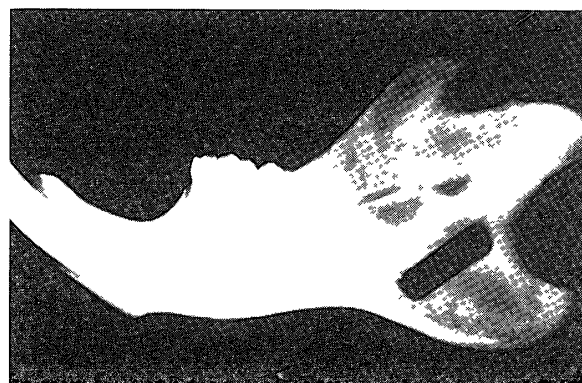


c. 7日目の欠損部分の二値化像

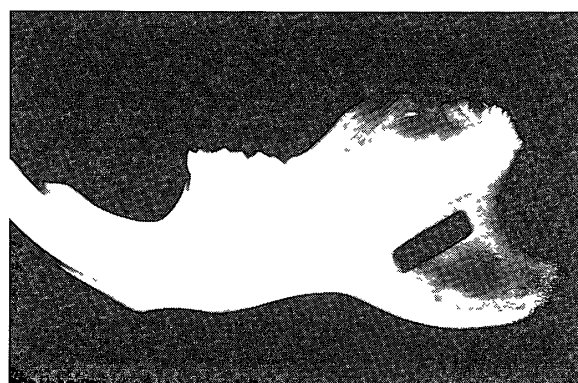


d. 7日目の骨欠損部分を含めた下顎角部の二値化像

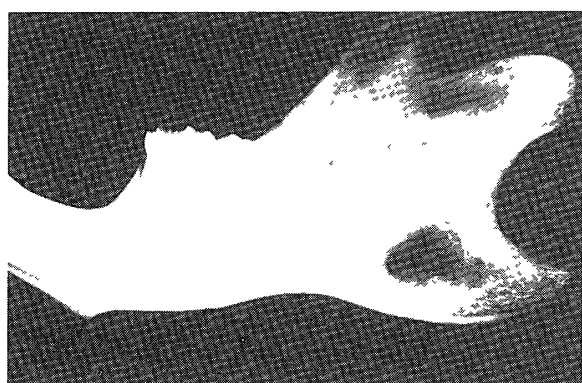
図8. 可動性骨欠損における画像解析像。



a. 直後



b. 7日目

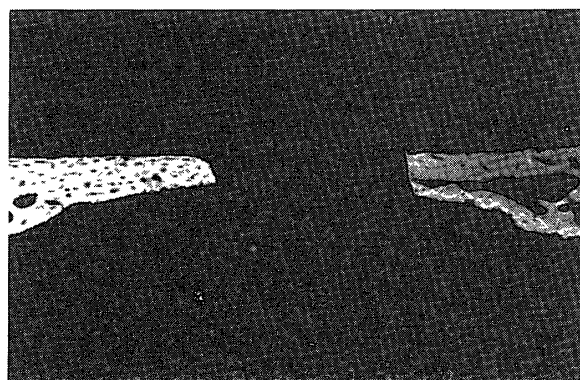


c. 14日目

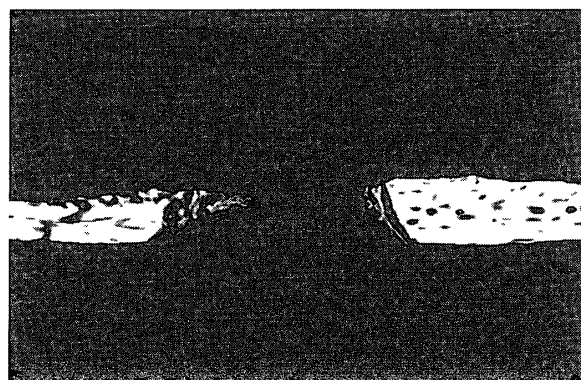


d. 28日目

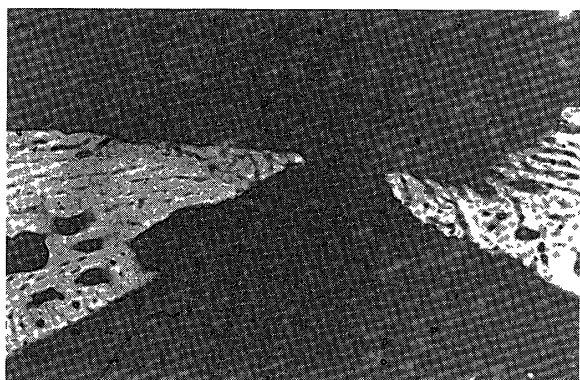
図9. SS投与群, 軟X線写真.



a. 直後



b. 7日目



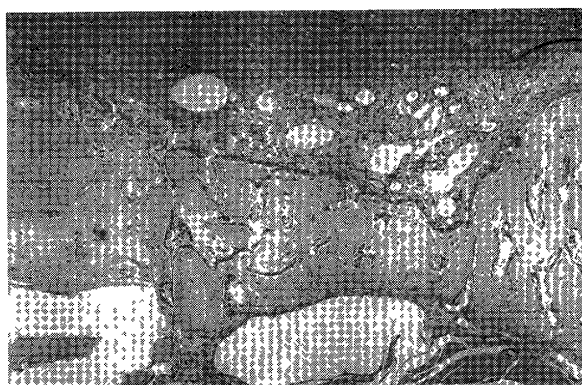
c. 14日目



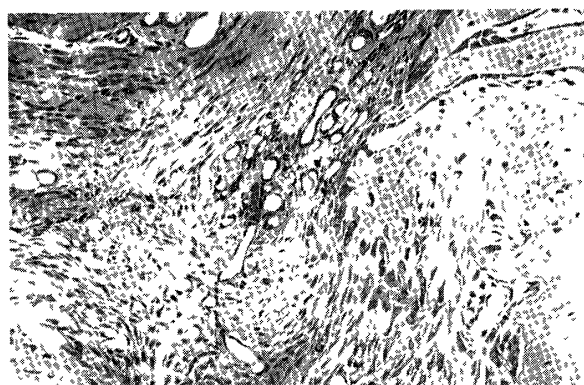
d. 28日目

図10. SS投与群, CMR.



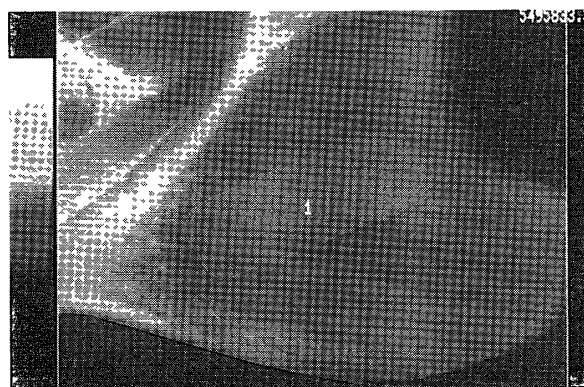


a. HE染色

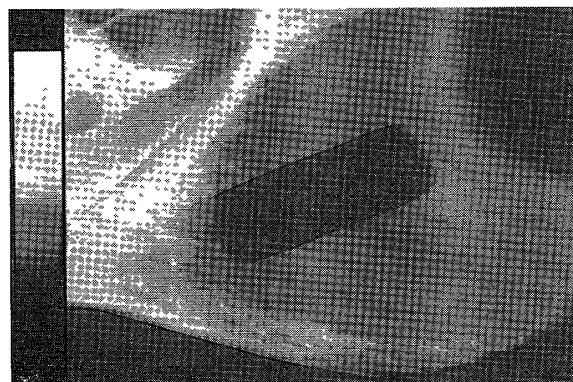


b. HE染色

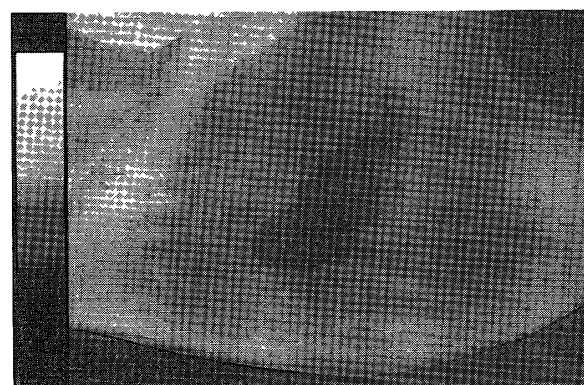
図11. SS投与群, 病理組織像.



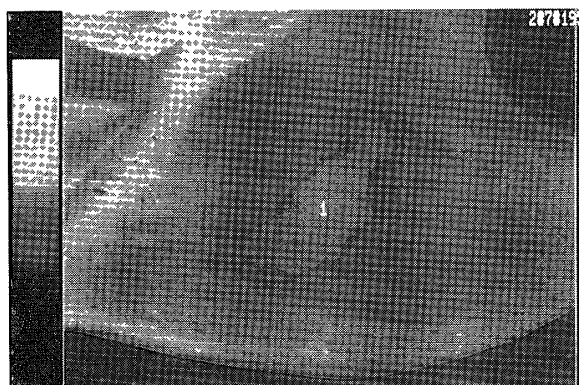
a. SS非投与群, 直後のカラー像



b. SS非投与群, 直後の骨欠損部分の二値化像



c. SS投与群, 14日目のカラー像



d. SS投与群, 14日目の骨欠損部分の二値化像

図12. SS非投与群およびSS投与群の画像解析像.

し非投与群に比較すると新生骨全体の形成幅が広く, 新生骨骨梁幅も太く形成されていた。28日目で骨癒合が認められた (図10 d)。

## (2) 病理組織学的観察

対照群であるSS非投与群に比較すると, 血管に富んだ肉芽組織の形成時期が早く, 頬骨仮骨組織の形成も早期に認められた (図11 a, b)。SS投与群では軟骨組織は観察されなかった。

## (3) 画像解析による検索

SS投与群とSS非投与群において測定した骨欠損面積の比較を行った (図12a-d)。

欠損作成直後の骨欠損面積は $5.98 \pm 0.63 \text{ mm}^2$ であった。骨欠損面積は投与群, 非投与群とも経時的に欠損面積の縮小を示した (表2, 図13)。t検定を行ったところ $p < 0.001$ で7, 14, 21, 28日目においてそれぞれ有意差が認められた。

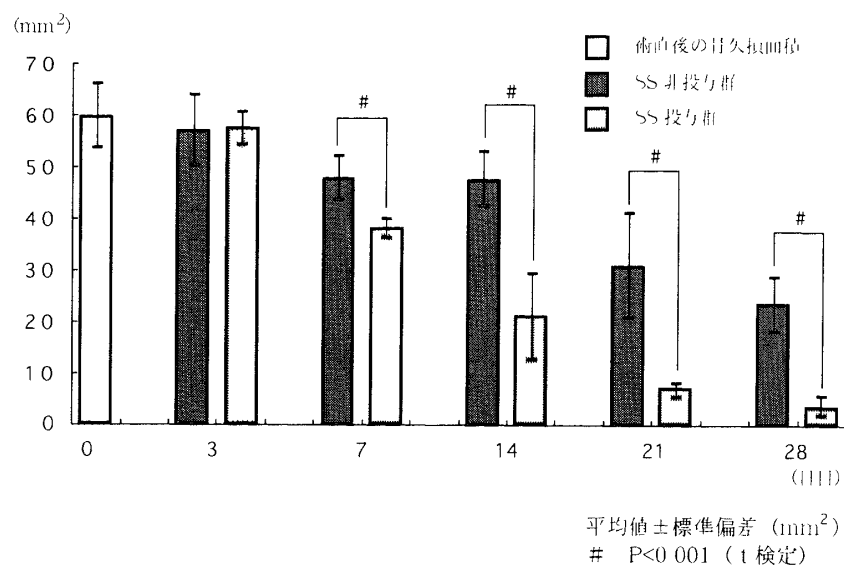


図13. ソルコセリル (SS) 投与による治癒効果 (骨欠損面積の比較)

表2 ソルコセリル (SS) 投与による治癒効果 (骨欠損面積の比較)

観察日	SS非投与群	SS投与群
0	5.98 ± 0.63 <sup>a, b</sup>	
3	5.71 ± 0.78	5.75 ± 0.25
7	4.96 ± 0.19	3.81 ± 0.17
14	4.77 ± 0.52	2.11 ± 0.84
21	3.10 ± 1.02	0.72 ± 0.09
28	2.35 ± 0.54	0.37 ± 0.03

a 骨欠損面積 (mm²)  
b 平均値 ± 標準偏差  
# P < 0.001 (t 検定)

投与群の方が骨欠損面積が小さく、すなわち新生骨形成量が多く、また、治癒経過が早いことが認められた。

#### IV. 考 察

##### 1. 骨欠損作成部位について

本研究で下顎骨顎角部を実験部位としたのは以下の理由からである。

1) 歯牙の影響を全く受けず膜性骨の治癒過

程の観察が可能であること、

2) 頭蓋骨に比べ周囲の筋や咀嚼の状態により影響を受けやすいため可動性骨欠損を作成するのに適した部位であり、かつ縫合部の存在がないため頬骨より非可動性骨欠損作成が確実であることなどから選択した。

##### 2. 可動性骨欠損と非可動性骨欠損の治癒過程の相違、および骨の可動性が及ぼす影響について

両者の治癒過程では以下のような相違が観察された。

軟X線写真により可動性骨欠損においては7日目で骨片の移動と偏位が観察され、14日目で既に偏位した状態で架橋の形成が認められた。すなわち、可動性骨欠損では骨片の可動性により欠損部間の幅が短縮し、骨断端が非可動性のものより互いに近接する状態になったことで骨癒合が早期に獲得され、非可動性骨欠損より治癒を早めたと考えられる。しかし、骨癒合が一定でないために下顎角部の変形が生じたものと思われた。非可動性骨欠損ではやや骨癒合の獲得が遅延していたものの、欠損内部に向かって規則正しく新生骨が形成されたため同部の骨の変形は観察されなかった。

CMRで観察すると、外骨膜反応と新生骨の形成される部位が明らかとなった。すなわち、可動性骨欠損での新生骨は主に外骨膜反応により形成されていたのに対し、非可動性骨欠損での外骨膜反応は僅かであり、新生骨は骨断端から直接形成される傾向があった。膜性骨の骨折における治癒過程での新生骨は、非可動性の骨欠損の結果のように、骨断端から直接形成され、外骨膜反応は比較的少ないとの報告が多い<sup>7,9)</sup>。しかし、その外骨膜反応による骨の形成過程について詳細に観察した報告もある。Barroら<sup>8)</sup>はイヌの口蓋骨で骨と骨膜との間に骨削除を行わずに骨膜剥離を行い再びもとの位置に復位した場合、外骨膜反応を起こさず骨髄すなわち内骨膜反応が見られるが、骨と骨膜との間に口蓋骨削除を行い間隙を形成すると外骨膜反応による骨形成が認められたと報告している。米原ら<sup>7)</sup>は血行を生理的な状態と同様に温存することが可能な血管柄付骨膜移植を膜性骨に施し、良好な外骨膜反応が確認できたことにより、長管骨の骨膜反応と同様に血流が重要な因子の一つとなっていると述べている。本研究における可動性骨欠損での著明な外骨膜反応は、骨の可動性による断端同士の接触から二次的に骨膜が剥離し、骨と骨膜の間に間隙が生じたこと、また頰側に特につよく観察されたのは骨離断による刺激と可動性のために骨膜内部および周囲部により多くの肉芽組織の形成が伴ったためであると考えられた。完全固定を想定した非可動性骨欠損では、可動による骨の偏位がないため局所の骨の変形を伴うことはなく、一時的にも局所の骨膨隆を引き起こす外骨膜反応も、可動性骨欠損に比べて極めて少なく下顎骨骨折治癒の修復においては、強固な固定すなわち完全固定を行うことがより重要であると考えられた。

### 3. 治癒過程における軟骨組織の出現について

膜性骨である下顎骨における骨折の治癒過程

での軟骨組織の出現の有無については未だ議論の絶えないところである<sup>7-18)</sup>。ヒト下顎骨の発生から考えると本研究での実験部位はラットの週齢からも膜内成長で形成された部分であり、発生時の軟骨組織の残留は全く否定できないが可能性は低いと思われる<sup>44,45)</sup>。西村ら<sup>46,47)</sup>は抜歯窩の治癒過程においてIIおよびX型コラーゲンのmRNAの検出を報告しているが、下顎歯槽骨がかつて軟骨成長であった下顎枝が移動した部分と考えればあり得ることと思われる。しかしながら、実際に抜歯窩治癒過程において軟骨組織を観察したとの報告は現在までのところ見あたらない。軟骨組織の発現にはさらに何らかの因子が必要なのかかもしれない。

軟骨組織の形成を認めたものでは骨固定を行っていない報告が多いが<sup>7,9,12,13,16)</sup>、骨縫合またはプレートによる固定を行ったものでも、軟骨組織を観察したとの報告も見られる<sup>23,35,36)</sup>。山崎<sup>23)</sup>はイヌの下顎骨をダイヤモンドディスクにより離断し、その後プレートと金属縫合により骨固定を行いその治癒過程を観察しているが、その中で金属固定を行った実験の一部に軟骨組織形成を観察している。軟骨組織の出現の理由として金属縫合による固定力の不確実性を挙げており、適切な固定のもとでは軟骨組織形成を見られないことを強調している。本研究においては、可動性骨欠損のみならず、完全固定を想定した非可動性骨欠損においても明らかな軟骨組織の出現が確認され、下顎骨骨折部の治癒過程における軟骨組織の形成が、骨折部の可動性、すなわち不確実な固定状態によるものであるとの、これまでの考えを否定するものであった。本研究での非可動性骨欠損が骨折の完全な固定と若干異なる点として、欠損部の大きさがダイヤモンドディスクを用いた骨折固定時における骨断端同士の間隙よりもやや広いことが考えられる。Radden and Fullmer<sup>17)</sup>はラット下顎骨に直径1.5から2mmの穴を作成しその治

癒過程を観察し、軟骨組織の存在は認められなかったと報告しているが、本研究で形成した欠損は $1.5 \times 4 \text{ mm}$ とそれらと比較すると大きいものがあり、軟骨組織形成には欠損の大きさも関与していることが考えられた。また、直径 $5 \text{ mm}$ の骨欠損を作成した後に、その欠損部分をe-PTFE(Gore Tex<sup>®</sup>)膜で被覆した場合は軟骨組織を介さずに新生骨形成がされるとの報告もある<sup>48)</sup>。

下顎骨の発生過程において、急速に成長する歯槽突起の一部に軟骨様組織の出現することも報告されている<sup>49-51)</sup>。この点に関して飯村<sup>51)</sup>は、軟骨組織は骨の成長断端にのみ存在しており、その先端には未分化間葉細胞の凝集が見られたことより、骨の急速な成長により結合組織との間に低酸素の状態が生じ、軟骨組織が出現したものと推測している。細胞生物学的に軟骨組織は、種々の間葉系細胞が脱分化し未分化間葉細胞を経由して再分化するとの報告がなされているが、特に局所の酸素分圧の低下がその誘導の一つとされている<sup>52)</sup>。

膜性骨の骨成長時の骨間、すなわちヒト下顎結合部、マウス前頭間縫合および正中口蓋縫合などでも軟骨形成がされているが、特に頭蓋骨に拡大装置を装着した場合に軟骨形成がされること<sup>15)</sup>を併せて考慮した場合、力学的負荷により軟骨組織が形成されることも考えられた。

#### 4. 実験モデルとしての有用性について

骨折の治癒過程を検索したものの大半は非観血的に骨折を誘発させたものであり<sup>19-22,37)</sup>治癒過程を主に形態的な手法によって観察する場合はその再現性という点で大きな問題があると考えられる。また、骨折後に固定を施したものを観察するために、ワイヤーあるいはプレートによる固定を行った実験が行われてきた<sup>12,28,32,34,35)</sup>が、これらの固定方法は骨としての厚みを必要とするため、大動物でなければならぬばかりではなく、ワイヤーの緩みによる骨

片の移動の可能性やプレート維持のネジによる骨腐蝕や固定操作に伴う既存骨の損傷が治癒に影響を及ぼすものと考えられている<sup>41-43)</sup>。本研究では可動性骨欠損として、下顎角部のバーによる離断を行い、完全固定を想定した非可動性骨欠損としては下顎角部の穿孔を行い、一定条件の骨欠損を作成した。両骨欠損とも作成は小動物でありながら容易に行うことができた。しかし、可動性骨欠損は考察2に記したような骨の可動性による影響が生じること、また欠損の大きさを画像解析により測定した結果では、可動性骨欠損は骨欠損面積の測定は7日目で困難になるなどの難点が認められた。これに対し非可動性骨欠損は、骨の偏位などは起こさず、また一定した大きさの骨欠損を作成することが可能で誤差も少なかった。また、膜性骨では治癒過程における外骨膜性反応は少ないという特徴も再現していた。

以上から、本研究で作成した非可動性骨欠損は、小動物に一定の骨欠損を作成することができその作成も容易でかつ再現性も高く、膜性骨の治癒過程の特徴を呈することから、膜性骨の治癒過程を検索する実験モデルとしては極めて有効であるものと考えられた。

#### 5. SSの効果について

SSは比較検討がより確実な非可動性骨欠損に投与しその影響の検討を行った。

SS投与群とSS非投与群の治癒過程を比較すると、SS投与群において旺盛な外骨膜反応、早期の新生骨形成および新生骨形成量の増加、軟骨組織を伴わない骨性治癒、血管に富んだ肉芽組織の早期形成などが観察された。

SSは幼牛溶血からの抽出物質で、その70%は、Na, K, Clなどを主成分とした無機物で、残り30%がアミノ酸、ペプチド、糖および有機酸などの有機物である。その薬理作用は各種臓器における網内系賦活作用、細胞内呼吸促進作用ならびに局部細胞の酸素代謝障害の回復など

が考えられており、その結果組織再生を促進させるといわれている。

先に記した旺盛な外骨膜反応および軟骨組織の形成が見られないことは、SSの主な作用である酸素代謝の改善の結果であると考えられる<sup>53-56)</sup>。つまり骨膜に存在する血管系細胞の活性化により、また低酸素状態の改善により軟骨組織が形成されなかったものと思われる。低酸素状態の改善は肉芽組織中の著しい血管形成量がそれを裏付ける所見と思われる。低酸素状態による軟骨組織の発現は、SS投与群の結果からさらに肯定的に考えられた。

SSは臨床的には胃および十二指腸胃潰瘍、皮膚の潰瘍、皮膚・粘膜の放射線障害、脳血管障害の後遺症に対し有効であるといわれている。一方歯科口腔領域では歯科用ペーストが開発され、口内炎やドライソケットに応用されている。骨折治癒に応用したものにはGabka<sup>57)</sup>の臨床報告がある。Gabkaは532例の顎骨骨折の258例（非観血的180例・観血的78例）に2 ml/day筋注で10日間投与し、274例の非投与例と比較したところ、非観血的では16日間、観血的では4日間治癒が早かったと述べている。しかしながら、SSの骨折治療への応用に関する基礎的研究は少なく、福田ら<sup>36)</sup>の報告が見られるのみでイヌの下顎骨に作成した人為的骨折にSS投与を行い、その治癒経過の組織学的観察からSSの効果を評価した。その結果から、血管系における細胞活性の増加が未分化間葉組織を刺激し造骨能が促進すると考えたと報告している。

本研究の結果から旺盛な外骨膜反応が認められたが、これは骨膜の血管系細胞が活性化されたためと考えられる。また、血流量の増加に伴い骨新生の亢進および形成量が増加したものと思われる。

## V. 結 論

ラットと下顎骨に可動性骨欠損と非可動性骨欠損を作成し、治癒過程を経時的に観察することで骨の可動性が治癒に及ぼす影響、とくに軟骨形成の影響、本法で作成した骨欠損が治癒過程の研究に対する実験モデルとしての是非についての検討、およびソルコセリル<sup>®</sup>が治癒過程に及ぼす影響の検討を行い、以下の結論を得た。

1. 可動性骨欠損と非可動性骨欠損では骨修復過程において、可動性骨欠損は主に、著明な外骨膜反応による骨新生を生じ長管骨骨折治癒過程と類似した所見を呈したのに対し、非可動性骨欠損では主に内骨膜性による骨新生が認められた。

2. 骨の可動性が骨の修復に及ぼす影響は、骨膜剥離による著明な外骨膜反応とそれに伴う外仮骨の形成、離断された骨片の偏位と欠損幅の短縮、欠損幅の短縮による早期の骨癒合、および骨片移動による下顎骨形態の変形、とくに下顎角の短小化であった。

3. 軟骨組織は骨の可動性の有無に関わりなく両方に形成が認められた。骨の可動性は軟骨組織形成に関連性がないことが示唆された。しかし形成量は可動性骨欠損に多いことから軟骨組織の形成量は骨の可動性と関係していることが考えられた。

4. 本法で作成した非可動性骨欠損は、作成方法も容易で再現性が高く、膜性骨の治癒過程を再現し、治癒過程研究に対する実験モデルとして有用であると考えられた。

5. 骨修復過程におけるソルコセリル<sup>®</sup>の影響は、早期の新生骨の形成および新生骨形成量の増加、および外骨膜反応の亢進などの治癒促進効果が認められ、その有用性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終わるにあたり、終始、本研究遂行と



御校閲を賜りました北海道医療大学歯科放射線学講座金子昌幸教授に感謝の意を表し、また貴重な御助言ならびに御校閲を賜った口腔病理学講座 賀来 亨教授および口腔解剖学第II講座 武田正子教授に深謝致します。そして本研究に対して御協力くださいました歯科放射線学講座および口腔病理学講座の教室員の皆様に心から感謝いたします。

### 参考文献

- 1) 平川 寛 骨折治癒機転の考え方の変遷。  
整・災害32 1141-1150, 1989
- 2) 高橋栄明 第13章 骨折の病態病理  
(13・2 骨折の形態的機序), 骨の科学, 須田立雄,  
小沢英岳, 高橋栄明 著, 医歯薬出版, 第3版, 東  
京, 1986, 212-213頁
- 3) 大家 清 第5章 創傷の治癒, 歯学生のための  
病理学 一般病理編, 二階堂宏昌, 岡邊治男 編集,  
医歯薬出版, 第1版, 東京, 1989, 90-95頁
- 4) 石垣正美, 上野博嗣, 二階堂元重, 瀧慶治, 伊室  
貴, 室田影久 実験的開放骨折に対する いわゆる  
“golden hour”に関する検討. 骨・関節感染症・5  
15-17, 1991
- 5) 石垣正美, 上野博嗣, 飯田勝訓, 二階堂元重, 白  
髭 晃, 瀧 慶治, 室田影久・開放骨折に関する研究.  
骨・関節感染症 4 1-2, 1990
- 6) 鈴木五郎・骨組織再生ニ關スル研究(1)實驗的研究  
(第4報) 日整会誌 3 174-186, 1928
- 7) 米原啓之, 高戸 孝, 須佐美隆史, 波利井清紀,  
小室裕造 膜性骨の骨形成に関する実験的研究-第  
1報 骨欠損部分の修復課程について- 日形会誌  
14 197-207, 1994
- 8) Barro W B, Latham A R Palatal periosteal  
response to surgical trauma Plast Reconstr Surg  
67 6-16, 1981
- 9) Craft P D, Mani M M, Pazel J, Masters F W  
Experimental study of healing in fracture of  
membranous bone  
Plast Reconstr Surg 53 321-325, 1974
- 10) Mulliken J B, Glowacki J Induced  
osteogenesis for repair and construction in the  
craniofacial region  
Plast Reconstr Surg 65 553-559, 1980
- 11) Kaban L B, Glowacki J Induced osteogenesis  
in rat repair of experimental mandibular defects  
in rat  
J Dent Res 60 1356-1364, 1981
- 12) Grgis F G, Pritchard J J Experimental pro-  
duction of cartilage during the repair of fractures  
of the skull vault in rat J Bone Joint Surg 40  
274-281, 1958
- 13) Gransto G, Nilsson L P Experimental man-  
dibular fracture Studies on bone repair and  
remodellation Scand J Plast Reconstr Surg 21  
159-165, 1987
- 14) Gromson K S Healing of fractures of the  
mandible and zygoma JADA & DCos 24  
1458-1469, 1937
- 15) Remmler D, McCoy F J, O'Neil D, Willoughby  
L, Patterson B, Gerald K, Morris D C Osseous  
expansion of cranial vault by craniotaxis Plast  
Reconstr Surg 89 787-797, 1992
- 16) Rever L J, Manson P N, Randolph M A, Yar-  
emchuk M J, Weiland A, Siegel H J The hea-  
ling of facial bone fractures by the process of  
secondary union Plast Reconstr Surg 87  
451-458, 1991
- 17) Radden B G, Fullmer H M Morphological and  
histochemical studies of bone repair in the rat  
Archs oral Biol 14 1243-1252, 1969
- 18) Dalton W J A study of the healing process  
following operative interference with the continu-  
ity of the rat maxilla J Dent Res 31 230-238,  
1952
- 19) 金子昌幸, 金子和子 顎骨の骨折治癒過程に関す  
る放射線学的研究ならびに電子顕微鏡学的研究. 口  
科誌 39 158-168, 1990.
- 20) 金子和子, 前田静一, 郭 東英, 小林光道, 金子  
昌幸 ラット顎骨骨折治癒過程の関する研究. 口科  
誌 38 66-81, 1989
- 21) 金子昌幸, 大西 隆, 金子和子, 後藤邦彦, 稲垣  
肇, 竹林義人, 神田秀治, 高野英明, 小林光道 骨  
折治癒過程のX線写真検査とマイクロラシオクラ  
フィによる観察. 東日本歯学誌 8 9-18, 1989.
- 22) 金子昌幸, 前田静一, 後藤邦彦, 佐野友昭, 郭 東  
英, 大西 隆, 金子和子 骨折治癒過程の実験的検  
討一軟X線所見とマイクロラシオグラム所見を中心  
に一. 東日本誌 6 31-37, 1987.
- 23) 山崎安仁 骨縫合および圧迫骨縫合術後の下顎骨  
骨折治癒過程に関する実験的研究, とくにX線マイ

- クロアナライザによる観察. 歯科学報 80 619-651, 1980.
- 24) 久野吉夫 顎骨損傷時の $^{22}\text{P}$ および $^{32}\text{S}$ 代謝に関する研究. 歯学56:355-378, 1968.
- 25) 飯塚哲夫 顎骨損傷時の $^{45}\text{Ca}$ および $^{60}\text{Fe}$ 代謝に関する研究. 歯学 52:360-381, 1965.
- 26) 太田 舜: 下顎骨骨折治癒過程に関する放射線学的研究 金沢医理叢書 84 37-61, 1970.
- 27) 小沼孝行 骨破壊時のアコースティック・エミッション (音響効果) の測定—骨折部位, 時期, 範囲の推定に関する基礎的研究—. 日口外誌 36:1213-1229, 1990.
- 28) 吉田正孝: 振動利用コヒーレンス関数解析による下顎骨骨折の治癒判定に関する研究. 日口外誌 35:569-588, 1989.
- 29) 加藤文度 下顎骨骨折における顎間固定を行わない固定法に関する研究—光弾性実験法による力学的研究および臨床的用例—. 日口外誌 34:635-647, 1988.
- 30) 尾上祐悦, 前田憲昭, 石川俊明, 本田公亮, 吉岡 済, 堤 定実 顔面骨の骨折に関する生力学的生力学的研究—第1報 静的荷重下の歪分布の計測—. 日口外誌 33:1932-1937, 1987.
- 31) 森 健 顎骨骨折治癒過程の機械的観察に関する研究. 日口外誌21 711-722, 1975.
- 32) 橋本 武: 創傷治癒に伴う血管の立体的観察—9, 実験的下顎骨離断による欠損部の治癒過程について—. 日口外誌 18:416-426, 1972.
- 33) Bell W H, Levy B M Revascularization and bone healing after posterior maxillary osteotomy J Oral Surg 29 313-320, 1971
- 34) 森 高廣: 創傷治癒に伴う血管の立体的観察—8, 実験的下顎骨骨折による歯槽動脈切断部に变化について—. 歯科学報 33 167-184, 1970.
- 35) 金子 譲 骨折ならびに骨髓炎における血管像の変化に関する実験的研究 第1編下顎骨骨折治癒過程における血管像 歯科学報 67:1474-1501, 1967.
- 36) 福田仁一, 山田長敬, Henning G, 瀬戸皖一 顎骨骨折の治癒へのソルコセリルの影響に関する実験的研究. 日口外誌 35:2261-2271, 1989.
- 37) 後藤邦彦 塩化第一錫投与によるラット顎骨骨折治癒過程の変化—放射線学的観察を中心に—. 東日本歯誌 12:49-69, 1993.
- 38) 長谷川明: 顎骨損傷時の $^{45}\text{Ca}$ 代謝に及ぼす諸薬剤の影響について. 歯学 57 378-401, 1969.
- 39) Fukuda J Tierexperimentelle Untersuchung uer die Wirkung von Solcoseryl auf das Knochenwachstum bei Kieferfrakturen (1) 九歯会誌 37 938-944, 1983
- 40) Gongloff R K, Whitlow W, Montgomery C K Use of collagen tubes for implantation of hydroxylapatite An experimental study J Oral Maxillofac Surg 43 570-573, 1985
- 41) 山萬毅彦, 山口 晃, 西村恒一 チタン骨ネジ埋入後の固定力の経時的変化に関する研究. 日口外誌 40:88-106, 1994.
- 42) 近藤寿朗 骨ネジ周囲骨組織の損傷と修復に関する病理学的観察. 鶴見歯学 11 37-59, 1985.
- 43) 小坂一彦, 山口 晃, 西村恒一: チタン骨ネジの固定に関する研究. 日口外誌 37:1143-1152, 1991.
- 44) Ten Cate A R Development mandible Ten Cate A R, editor Oral Histology Development, Structure and Function 4th edition Mosby, St Louis 1994, PP 34-38
- 45) Enlow D H and Dale J G Childhood facial growth and development Ten Cate A R, editor Oral Histology 4th edition Mosby, St Louis 1994, PP 469-513
- 46) 西村一郎, Ting K, 歯科臨床と歯槽骨. The Quintessence 12 3-10, 1993
- 47) Ting K, Petropulos L A, Iwatsuki M, Nishimura I Altered cartilage phenotype expressed during intramembranous bone formation J Bone Miner Res 8 1377-1387, 1993
- 48) Dahlin C, Sandberg E, Alberius P, Linde A Restoration of mandibular nonunion bone defect Oral Maxillofac Surg 23 237-242, 1994
- 49) 大草信人 形成期ラット歯槽縁に出現する軟骨様組織の走査電子顕微鏡的観察. 昭歯誌 11:188-200, 1991.
- 50) Akimoto A, Sasa R, Segawa K, Takiguchi R Morphological characterization of chondroid bone in the alveolar crest of the neonatal rat mandible Jpn J Oral Biol 33 396-399, 1991
- 51) 飯村秀彦: ヒト胎児下顎骨の成長変化に関する組織学的研究. 奥羽大歯学誌20:170-185, 1993.
- 52) 山村武夫 歯髄, 歯周組織および根尖 (根端) 組織の病理. 歯科学報 89:1859-1888, 1989.
- 53) Ueda M, Akita S, Torii S, Kaneda T, Oka T Effect of solcoseryl on flap survival Nagoya J Med Sci 44 22-30, 1981
- 54) 吉田 宏 幼牛血液抽出剤Solcoserylに関する実

- 験的研究。岡山医学会雑誌81 251-257, 1959.
- 55) 井上昌一, 森 登, 国仲晃行 ソルコセリルの生化学的研究。基礎と臨床 8 5-10, 1974.
- 56) 木村規矩志, 島筒哲夫, 大膳澄人, 後藤尹彦 新薬「ソルコセリル」の皮下結合繊維組織に及ぼす影響。広島医学 15 1306-1310, 1962.
- 57) Gabka J Actihaemyl in der Kiefer-und Gesichtschirurgie unter Berücksichtigung tierexperimenteller Ergebnisse Med Monatsschr 21 175-180, 1967